

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Xenobiotikum transzporterek vizsgálata humán keratinocitákban és bőrben

Bebes Attila



Témavezető:

Dr. Széll Márta

tudományos tanácsadó

Szegedi Tudományegyetem

Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2011

Bevezetés

Az emberi szervezet a környezet számos nem kívánatos káros anyagával kerül kapcsolatba, ami elkerülhetetlen a táplálkozás, a légzés és egyéb, környezettel való kapcsolattartást igénylő folyamatok működése közben. A szervezet számára idegen anyagok – az úgynevezett xenobiotikumok – szerkezetükben, kémiai tulajdonságaikban és méretükben is igen különböző molekulák. Többszintű védekező rendszer áll rendelkezésre, hogy megakadályozza a xenobiotikumok szervezetbe való bejutását, illetve megbirkózzon a már felszívódott anyagokkal, és mielőbb megszabaduljon tőlük. Ennek a védelmi rendszernek a tagjai az ABC transzporter fehérjecsaládba tartozó xenobiotikum transzporterek.

A humán ABC transzporterek 10 tagjáról ismert, hogy szerepet játszanak a multidrog rezisztencia kialakításában, ezeket a fehérjéket xenobiotikum transzportereknek is nevezik. Ezen proteinek közös tulajdonsága a rendkívül széles szubsztrátspecifitás, ezért a tumorokban való megjelenésük számos kemoterápiás szerrel szemben teszik ellenállóvá a tumorsejteket, így jelentősen csökkentve a terápia hatékonyságát. Kezdeti kutatások főként a xenobiotikum transzporterek kemoterápiára rezisztens tumorokban játszott szerepére fókuszáltak, azonban számos érdekes adat látott arról is napvilágot, hogy fiziológiai körülmények között is fontos feladatokat látnak el a szervezetben. A xenobiotikum transzporterek kifejeződésének igen nagy a jelentősége a különböző határfelületeken, hiszen egyrészt meggátolják a környezetből érkező idegen anyagok felszívódását, másrészt szerepet játszanak a szervezetbe jutott és a detoxifikációs rendszer által feldolgozott idegen molekulák kiszűrésében is.

Az epidermisz az egyik legnagyobb kiterjedésű és legfontosabb mechanikai és kémiai permeabilitási gát a szervezetben. Feltehetően az epidermisz biokémiai védekező rendszerének fontos elemei a xenobiotikumok metabolizmusában részt vevő fehérjék, mint például a citokróm P450 proteinek és a xenobiotikum transzporterek. Számos xenobiotikum transzporter kifejeződését megfigyelték normál humán keratinocitákban, valamint az ABCB1 és az ABCC1 transzporterek sejtmembránhoz asszociált festődését is leírták humán epidermiszben. Egér bőrben végzett vizsgálatok alapján ismert, hogy egyes xenobiotikum transzporterek a gyógyszermolekulák bőrön keresztül való felszívódására, szervezetben való eloszlására és hozzáférhetőségére is hatást gyakorolnak.

Célkitűzés

- Az ABC transzporter fehérjecsaládba tartozó xenobiotikum transzporterek humán bőrben betöltött funkcióiról kevés adat áll rendelkezésre az irodalomban. Elsődleges célunk az ABCB1 (Pgp/MDR1), ABCC1-6 (MRP1-6) és az ABCG2 (BCRP) gének részletes expressziós vizsgálata volt, *in vitro* humán keratinocita proliferációs/differenciációs modell rendszerekben.
- Az ABCC4 és ABCG2 gének esetén kapott expressziós eredmények proliferációhoz kapcsolt kifejeződésre utaltak.
 - Célul tűztük ki az ABCC4 és ABCG2 fehérjék kifejeződésének részletes vizsgálatát a már említett *in vitro* keratinocita modellekben.
 - Elhatároztuk továbbá, hogy az ABCC4 és ABCG2 transzporterek keratinocita proliferációban betöltött funkcióját siRNS által közvetített génspecifikus csendesítéssel, valamint kémiai gátlók alkalmazásával fogjuk tanulmányozni.
- *In vitro* vizsgálataink eredményei alapján az ABCC4 és ABCG2 transzporterek kifejeződésének vizsgálatát kiterjesztettük humán bőrre is, különös tekintettel a felmerülő terápiás lehetőségekre.
 - Az ABCC4 transzporter fehérje expresszióját pikkelysömörös betegek bőrében tanulmányoztuk, majd célul tűztük ki a pikkelysömör terápiájában alkalmazott methotrexát keratinocitákra gyakorolt hatásának vizsgálatát *in vitro*, különböző transzporter gátlók alkalmazása mellett.
 - Célul tűztük ki az ABCG2 transzporter kifejeződésének vizsgálatát különféle nem-melanóma típusú bőrgyógyászati kórképekben. Célunk volt az ABCG2 transzporter – mint lehetséges célmolekula – szerepének tanulmányozása egyes bőrgyógyászati eredetű kórképek esetében alkalmazott fotodinámiás terápia hatékonyságának növelése érdekében.

Alkalmazott módszerek

- Keratinocita differenciációs modellek HaCaT keratinocita sejtvonal és normál humán keratinociták felhasználásával
- Valós idejű reverz-transzkriptáz PCR
- Western blott és immuncitokémia vizsgálatok az ABCC4 és ABCG2 fehérje mennyiségének meghatározására
- Áramlási citometriás vizsgálatok plazmamembrán ABCG2, valamint intracelluláris porfirin szint meghatározására
- ABCC4 és ABCG2 gének csendesítése siRNS módszerrel
- Viabilitás mérés 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) esszével
- Valós idejű sejtproliferációs analízis (XCELLigence)
- Immunhisztokémiai festés a szöveti ABCC4 és ABCG2 kimutatására
- *In vitro* fotodinámiás terápia HaCaT sejtek felhasználásával

Eredmények

1. Az ABCC4 és az ABCG2 transzporterek proliferációhoz kapcsolódó módon fejlődnek ki *in vitro* keratinocita proliferációs/differenciációs modellekben

Valós idejű reverz-transzkriptáz PCR segítségével vizsgáltuk az ABCB1, ABCC1-6 és az ABCG2 xenobiotikum transzporter gének expressziós profilját keratinociták proliferációja/differenciációja során. A vizsgált nyolc xenobiotikum transzporter gén közül az ABCC4 és az ABCG2 két független sejtes modellben is proliferációhoz kapcsolt expressziót mutatott.

A szinkronizált HaCaT keratinocita modellben egy kéthetes kontakt gátláson és szérumban éheztetésen alapuló folyamat során a sejtek proliferációban inaktívvá válnak és jelentősen differenciált állapotba kerülnek, majd ebből a sejtnyugalmi fázisból lépnek ki a kontakt gátlás megszűnése és a tápfolyadék szérummal való kiegészítése után. Ezzel párhuzamosan a differenciációs markerek kifejeződése csökken, a proliferációs markerek kifejeződése nő, valamint gyors szinkron osztódások sorozata figyelhető meg. Szinkronizált HaCaT sejtekben az intenzív proliferációval együtt indukálódott az ABCC4 és az ABCG2 mRNS szint.

Normál humán keratinocitákban kontakt gátlás és magas Ca^{2+} koncentráció segítségével indukáltuk a sejtek terminális differenciációját. A differenciáció előrehaladtával mind az ABCC4, mind az ABCG2 mRNS szintekben csökkenést tapasztaltunk. Western blott és immuncitokémiai vizsgálataink szerint az ABCC4 és ABCG2 fehérjék mindkét modellben a proliferáló sejtekben voltak jelen nagy mennyiségben, jó korrelációt mutatva a génexpressziós eredményekkel.

2. Normál humán keratinocitákban az ABCC-típusú transzporterek gátlása megakadályozza a sejtek proliferációját

HaCaT sejteket és normál humán keratinocitákat kezeltünk az ABCC-típusú transzportereket gátló probeneciddel, és az ABCG2 funkcióját specifikusan gátló Ko-134-gyel. A sejtek proliferációját valós időben követtük nyomon a 72 órán át tartó kezelés során. HaCaT sejtekben a kontrollhoz hasonló mértékű proliferációt mutattunk ki probenecid és Ko-134 kezelés hatására. Az ABCC4 és ABCG2 gének specifikus csendesítése szintén nem befolyásolta a sejtek viabilitását. Normál humán keratinocitákban az ABCC-típusú transzporterek funkciójának kiesése sejtpusztulást ugyan nem okozott, azonban a sejtek osztódását gátolta a probenecid kezelés. A Ko-134 kezelés normál keratinocitákban sem volt hatással a sejtek viabilitására és proliferációjára. Tehát az ABCC-típusú transzporterek, köztük az ABCC4, szerepet játszhatnak a keratinociták proliferációjában.

3. Az ABCC4 transzporter nagymértékben kifejeződik a pikkelysömörös léziós epidermisz hiperproliferáló keratinocitáiban

Egészséges személyek és pikkelysömörös betegek nem-léziós bőrében az epidermális dendritikus sejtek mutattak ABCC4 immunpozitivitást. A léziós epidermiszben azonban a bazális keratinociták is számottevő mértékben fejezték ki az ABCC4 fehérjét. Az ABCC4 transzporter részt vehet a keratinociták abnormális proliferációjához vezető folyamatokban, valamint hozzájárulhat a betegség kezelésében használt gyógyszerek, például a methotrexát hatékonyságának befolyásolásához.

4. A HaCaT sejtek methotrexát rezisztenciájában az ABCC-típusú transzporterek játszanak meghatározó szerepet

Számos xenobiotikum transzporter ismert szubsztrátja a methotrexát, amely a pikkelysömör terápiájában is alkalmazott gyógyszer. A HaCaT sejtek nagymértékben

rezisztensek voltak a rövidtávú methotrexát kezelésre, ez a jelenség a sejtekben kifejeződő xenobiotikum transzporterek működésének is tulajdonítható. A négyórás kezelés során különböző transzporter gátlószereket alkalmazva vizsgáltuk, hogy melyik fehérje felelős a rezisztencia kialakításáért. Az ABCC-típusú transzportereket gátló probenecid és indomethacin megszüntette a sejtek methotrexát rezisztenciáját, és szignifikáns mértékben növelte a rövidtávú methotrexát kezelés toxikus hatását. Az ABCC4 transzporter specifikus inhibitoraként jellemzett 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid a sejtekre önmagában is jelentős toxikus hatást gyakorolt, így élő sejteken transzporter gátlóként nem alkalmas további vizsgálatokra.

5. Az ABCG2 transzporter nagymértékű expressziója figyelhető meg pikkelysömörös léziókban, valamint különböző nem-melanóma típusú bőrtumorokban

Az ABCG2 transzporter egészséges epidermiszben gyenge, a bazális keratinocitákra korlátozódó festődést mutatott, a szuprabazális epidermisz negatív volt. Az ABCG2 transzporter tekintetében a pikkelysömörös nem-léziós bőr az egészséges bőrhöz hasonló képet mutatott. A pikkelysömörös léziós epidermiszben nagymértékű ABCG2 fehérje expressziót detektáltunk a szuprabazális rétegekben. Érdekes módon a hiperproliferáló bazális régióban elhelyezkedő keratinociták kismértékű ABCG2 pozitivitást mutattak. Ezek az eredményeink egybecsengenek az *in vitro* keratinocitákon végzett funkcionális vizsgálataink eredményeivel, amely szerint az ABCG2 transzporter a keratinocita proliferációban nem játszik kiemelkedő szerepet. Különféle nem-melanóma típusú bőrtumorokban számos esetben jelentős ABCG2 fehérje felhalmozódást tapasztaltunk. A bazális keratinocitákból kiinduló bazaliómák esetén a tumorsejtek festődése kevésbé volt jellemző, azonban az elváltozás közelében, az epidermisz szuprabazális rétegeiben nagymértékű ABCG2 pozitívitas mutatkozott. Laphám karcinóma, Bowen karcinóma, keratoakantóma, hám hiperplázia esetén a tumorsejteket az ABCG2 fehérje jelentős kifejeződése jellemezte.

6. HaCaT sejtekben a szabad porfirinek felhalmozódása az ABCG2 transzporter kifejeződésétől függ

Az ABCG2 transzporter nagymértékben kifejeződik az epidermiszben különböző patológiás bőrelváltozásokban, mint például a bazalióma körülötti epidermiszben, valamint a laphám karcinómában. Ezen betegségek gyógyításában

fontos szerepe van a fotodinámiás terápiának. Az ABCG2 fehérjéről ismert, hogy közreműködik a porfirinek sejtekből való kipumpálásában, ezért feltételeztük, hogy célmolekulája lehet olyan eljárásoknak, amelyek célja a fotodinámiás terápia hatékonyságának javítása. Ennek a hipotézisnek a modellezésére *in vitro* PDT kísérletet terveztünk HaCaT keratinociták felhasználásával. A sejteket delta-aminolevulinsavval (DALA) kezeltük, amely az intracelluláris szabad porfirinszintet jelentősen megnöveli. Négyórás DALA előkezelést követően a sejtek porfirin tartalmát áramlási citometria segítségével határoztuk meg. Megvizsgáltuk az összefüggést a HaCaT keratinociták ABCG2 expressziója, valamint a felhalmozódó porfirin mennyisége között. Korábbi kísérleteink alapján tudtuk, hogy szinkronizált HaCaT sejtekben az ABCG2 xenobiotikum transzporter csak igen kismértékben fejeződik ki a differenciált keratinocitákban, míg mind mRNS, mind fehérje szinten jelentősen indukálódik a proliferáló keratinocitákban. Összehasonlítottuk a DALA kezelést követően felhalmozott porfirin szinteket differenciált és proliferáló HaCaT sejtekben. A nagymértékben differenciálódott mintákban mintegy 7,5-szerese volt a porfirin mennyiség a proliferáló sejteket tartalmazó mintákhoz képest. Megfigyeltük azt is, hogy az ABCG2 fehérje funkcióját Ko-134-gyel specifikusan gátolva a négyórás DALA kezelés során a differenciált keratinocitákban nem volt szignifikáns porfirin szint változás, míg a proliferáló sejtekben nagy mennyiségben kifejeződő ABCG2 transzportert Ko-134 kezeléssel gátolva a keratinociták porfirin tartalma további jelentős emelkedést mutatott.

7. Az ABCG2 transzporter specifikus gátlása növeli a fotodinámiás kezelés hatékonyságát HaCaT sejteken

HaCaT sejtek felhasználásával egy *in vitro* fotodinámiás terápiás modellben vizsgáltuk az ABCG2 specifikus gátlásának hatékonyságát a sejtek porfirin közvetítette fényérzékenységre. Négyórás DALA előkezeléssel fényérzékenyített sejteket Aktilite fotodinámiás terápiás készülékkel sugaraztunk be. Az ABCG2 specifikus gátlószere, a Ko-134, dózisfüggő módon növelte a HaCaT sejtek érzékenységét a fotodinámiás kezelésre.

Összefoglalás

- *In vitro* vizsgálataink alapján az ABCC4 és az ABCG2 transzporterek proliferációhoz kapcsolt kifejeződést mutattak keratinocitákban.
- Az ABCC4 transzporter szerepet játszhat normál humán keratinociták proliferációjában, a fehérje nagy mennyiségben kifejeződik pikkelysömörös léziós bőrben a hiperproliferáló keratinocitákban.
- Az ABCC-típusú transzporterek, köztük az ABCC4, részt vesznek a HaCaT sejtek methotrexát rezisztenciájának kialakításában.
- Az ABCG2 transzporter nagymértékű kifejeződését figyeltük meg különböző nem-melanóma típusú bőrtumorok esetén.
- Az ABCG2 fehérje a fényérzékenyítő porfirinek sejtekből való kipumpálása révén jelentős mértékben befolyásolhatja a fotodinámiás terápia hatékonyságát.

A dolgozat témaköréhez kapcsolódó közlemények:

Bebes A, Kis K, Nagy T, Kurunczi A, Polyánka H, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Dobozy A, Széll M: **The expressions of ABCC4 and ABCG2 xenobiotic transporters in human keratinocytes are proliferation-related.** *Arch Dermatol Res* (2011) in press, doi:10.1007/s00403-011-1174-4, IF: 2,011

Bebes A, Nagy T, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Dobozy A, Széll M: **Specific inhibition of the ABCG2 transporter could improve the efficacy of photodynamic therapy.** *J Photochem Photobiol B* (2011) **105**(2):162-166, IF: 2,116

Egyéb közlemények:

Tőkés T, Erős G, Bebes A, Hartmann P, Várszegi S, Varga G, Kaszaki J, Gulya K, Ghyczy M, Boros M: Protective effects of a phosphatidylcholine-enriched diet in lipopolysaccharide-induced experimental neuroinflammation in the rat. *Shock* (2011) **36**(5):458-465, IF: 3,203

Kormos B, Belső N, Bebes A, Szabad G, Bacsa S, Széll M, Kemény L, Bata-Csörgő Z: In vitro dedifferentiation of melanocytes from adult epidermis. *PLoS One* (2011) **23**; **6**(2):e17197, IF: 4,411

Kinyó Á, Kiss-László Z, Hambalkó S, Bebes A, Kiss M, Széll M, Bata-Csörgő Z, Nagy F és Kemény L: COP1 Contributes to UVB-Induced Signaling in Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* (2010), **130**(2):541-545, IF: 6,270

Secenji M, Hideg É, Bebes A, Györgyey J: Transcriptional differences in gene families of the ascorbate-glutathione cycle in wheat during mild water deficit. *Plant Cell Rep* (2010), **29**(1): 37-50, IF: 2,279